

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-163798

(P2001-163798A)

(43) 公開日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 35/28	2 G 0 4 5
		A 6 1 P 7/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 7/00		37/00	4 B 0 6 4
37/00		43/00	1 0 7 4 C 0 8 4
43/00	1 0 7	C 0 7 K 14/52	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-345542

(22) 出願日 平成11年12月3日 (1999. 12. 3)

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 大原 高秋

兵庫県神戸市垂水区青山台7-1-1-823

(72) 発明者 山下 憲司

香川県高松市神在川窪町332-3

(72) 発明者 京泉 誠之

広島県安芸郡府中町瀬戸ハイム3-24-5

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイクロフィリンを含有する造血幹細胞増殖剤

## (57) 【要約】

【課題】 ヒト造血幹細胞および造血前駆細胞を体外で従来よりも効率的に増殖させ得る造血幹細胞増殖剤を提供すること。本発明のさらなる目的は、各種の造血器官疾患、癌の放射線治療および化学療法の際の造血不全に対する治療薬として利用され得、血球の大量生産に利用され得、遺伝子治療時に造血幹細胞への遺伝子の導入効率の向上に利用され得、さらに診断薬および検査薬として活用され得る造血幹細胞増殖剤を提供すること。

【解決手段】 サイクロフィリンを含有する造血幹細胞増殖剤。上記サイクロフィリンは、配列番号1、2、3、または4で表されるアミノ酸配列のいずれかを有するポリペプチド、配列番号1、2、3、または4で表されるアミノ酸配列のいずれかにおいて1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはそれらの修飾体であり得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 サイクロフィリンを含有する造血幹細胞増殖剤。

【請求項2】 前記サイクロフィリンが、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体である、請求項1に記載の造血幹細胞増殖剤。

【請求項3】 前記サイクロフィリンが、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体である、請求項1に記載の造血幹細胞増殖剤。

【請求項4】 前記サイクロフィリンが、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体である、請求項1に記載の造血幹細胞増殖剤。

【請求項5】 前記サイクロフィリンが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体である、請求項1に記載の造血幹細胞増殖剤。

【請求項6】 前記修飾体が、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有し、かつそのアミノ末端がアセチル化されたポリペプチドである、請求項4に記載の造血幹細胞増殖剤。

【請求項7】 前記修飾体が、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有し、かつそのアミノ末端がアセチル化されたポリペプチドである、請求項5に記載の造血幹細胞増殖剤。

【請求項8】 配列番号3で表されるアミノ酸配列を有しかつアミノ末端がアセチル化されたポリペプチド、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、そのアミノ末端がアセチル化され、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド。

【請求項9】 配列番号4で表されるアミノ酸配列を有しかつアミノ末端がアセチル化されたポリペプチド、または配列番号4で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、そのアミノ末端がアセチル化され、

かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド。

【請求項10】 請求項1～7のいずれか1項に記載の造血幹細胞増殖剤を用いて非ヒト動物またはインビトロにおいて造血幹細胞または造血前駆細胞を増殖させる工程を包含する、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖方法。

【請求項11】 前記造血幹細胞増殖剤が、ヒトまたはマウス由来の骨髓腫細胞の培養上清である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記増殖工程において、造血幹細胞または造血前駆細胞に外来遺伝子が導入される、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 請求項1～7のいずれか1項に記載の造血幹細胞増殖剤を用いて非ヒト動物またはインビトロにおいてヒト組織幹細胞または組織前駆細胞を増殖させる工程を包含する、ヒト組織幹細胞または組織前駆細胞の増殖方法。

【請求項14】 請求項1～7のいずれか1項に記載の造血幹細胞増殖剤を含む、血液系の疾患の診断薬または検査薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、造血幹細胞の生存維持活性、増殖活性、および分化活性を有する造血幹細胞増殖因子としてのサイクロフィリン類を含有し、各種の造血器官疾患、癌の放射線治療および化学療法の際の造血不全に対する治療薬として利用され得る造血幹細胞増殖剤に関する。本発明の造血幹細胞増殖剤はまた、血球の大量生産、および遺伝子治療時の造血幹細胞への遺伝子導入効率向上に利用され得、さらに診断薬および検査薬として活用され得る。

【0002】

【従来の技術】造血幹細胞は、すべての成熟した血球に分化する能力（多分化能）と、自己と同じ能力を有する細胞を複製する能力（自己複製能）とを有し、長期にわたり造血を支持し続ける。ヒトの生体における造血は、一般に、細胞間の直接的な相互作用および体液中に存在する種々の物質（すなわち、液性の造血調節因子）により、調節されていると考えられる。細胞間の直接的な相互作用としては、造血幹細胞、特定の血球に分化することがコミットされた造血前駆細胞、およびこれらを取り巻く造血微小環境である間質細胞の間の相互作用が挙げられる。

【0003】液性の造血調節因子は、ここ十数年のバイオテクノロジーの進歩により、種々のものが見出された。例えば、エリスロポエチン（リンら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、82:7580（1985））、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）（ナガタら、EMBO J.、5:575（1986））、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子

(GM-CSF) (ミヤタケら、EMBO J、4:2561 (1985))、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF) (ウオングら、Science、235:1504 (1987))、トロンボポエチン(ソベッジら、Nature、369:533 (1994))、幹細胞因子(SCF) (アンダーソンら、Cell、63:235 (1990))、Flt-3リガンド(リマネットら、Cell、75:1157 (1993))、白血病増殖阻止因子(LIF) (スタールら、J. Biol. Chem.、265、(15):8833 (1990))、インターロイキン1(IL1) (クラークら、Nucleic Acids Res.、14、:7897 (1986))、インターロイキン3(IL3) (ドルサーズら、Gene、55:115 (1987))、インターロイキン6(IL6) (ヤスカワら、EMBO J、6:2939 (1987))、インターロイキン11(IL11) (ポールら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、87:7512 (1990))、インターロイキン12(IL12) (ウオルフら、J. Immunol. 146:3074 (1991)) などである。

【0004】これらのサイトカインはいずれも、造血幹細胞を、単独ではあまり増殖させることができず、ある程度増殖させるためには2つ以上、好ましくは3つ以上を組み合わせて用いることが必要である。したがって、造血幹細胞をより効率的に増殖させ得る血球増殖因子を提供することが望まれている。

【0005】サイクロフィリンは、免疫抑制剤サイクロスポリンAに結合する蛋白質として見出された(ハンドシュマッカーら、Science、226:544 (1984))。1989年に、この蛋白質はペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ(ロタマーゼ)という酵素と同一であり、サイクロスポリンAと結合することにより、その酵素活性が阻害されることが見出された(タカハシら、Nature、337:473 (1989))。サイクロフィリンの酵素活性は、ペプチジルプロリルアミド結合のシス-、トランス-回転異性体の転換を触媒するものである。

【0006】ヒトサイクロフィリンとしては、サイクロフィリンA(ヘンドラーら、EMBO J、6(4):947 (1987))、サイクロフィリンB(プライスら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、88(5):1903 (1991))およびサイクロフィリンC(シュナイダーら、Biochemistry、33(27):8218 (1994))が知られている。サイクロフィリンは、後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の構成蛋白質であるギャグ(gag)蛋白質と細胞質内で結合して、HIV-1粒子内に取り込まれることが明らかにされた(ルーバンら、Ce

ll、73:1067 (1993))。しかし、サイクロフィリンの幹細胞に対する生理作用については、報告された例がない。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ヒト造血幹細胞および造血前駆細胞を体外で従来よりも効率的に増殖させ得る造血幹細胞増殖剤を提供することにある。本発明のさらなる目的は、各種の造血器官疾患、癌の放射線治療および化学療法の際の造血不全に対する治療薬として利用され得、血球の大量生産に利用され得、遺伝子治療時の造血幹細胞への遺伝子の導入効率の向上に利用され得、さらに診断薬および検査薬として活用され得る、造血幹細胞増殖剤を提供することにある。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、マウス骨髄腫細胞(NS-1細胞)培養上清に造血幹細胞の増殖を活性化する蛋白質が存在することを見出した。本発明者らは、この蛋白質を分離、精製、および同定することにより、この蛋白質が造血幹細胞増殖因子として新規である、サイクロフィリン(サイクロフィリンB、サイクロフィリンA、および修飾型サイクロフィリンA)であることを明らかにし、それらの造血幹細胞増殖活性を利用することにより、本発明を完成するにいたった。

【0009】本発明の造血幹細胞増殖剤は、サイクロフィリンを含有する。

【0010】1つの実施態様では、上記サイクロフィリンは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体であり得る。

【0011】1つの実施態様では、上記サイクロフィリンは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体であり得る。

【0012】1つの実施態様では、上記サイクロフィリンは、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体であり得る。

【0013】1つの実施態様では、上記サイクロフィリンは、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチド、またはこれらの修飾体であり得る。

【0014】1つの実施態様では、上記修飾体は、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有し、かつそのアミノ末端がアセチル化されたポリペプチドであり得る。

【0015】1つの実施態様では、上記修飾体は、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有し、かつそのアミノ末端がアセチル化されたポリペプチドであり得る。

【0016】本発明のポリペプチドは、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有しかつアミノ末端がアセチル化されたポリペプチド、または配列番号3で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、そのアミノ末端がアセチル化され、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチドである。

【0017】本発明のポリペプチドは、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有しかつアミノ末端がアセチル化されたポリペプチド、または配列番号4で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、そのアミノ末端がアセチル化され、かつ造血幹細胞増殖活性を有するポリペプチドである。

【0018】本発明の造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖方法は、上記のいずれかの造血幹細胞増殖剤を用いて非ヒト動物またはインビトロにおいて造血幹細胞または造血前駆細胞を増殖させる工程を包含する。

【0019】1つの実施態様では、上記造血幹細胞増殖剤は、ヒトまたはマウス由来の骨髓腫細胞の培養上清であり得る。

【0020】1つの実施態様では、上記増殖工程において、造血幹細胞または造血前駆細胞に外来遺伝子が導入され得る。

【0021】本発明のヒト組織幹細胞または組織前駆細胞の増殖方法は、上記のいずれかの造血幹細胞増殖剤を用いて非ヒト動物またはインビトロにおいてヒト組織幹細胞または組織前駆細胞を増殖させる工程を包含する。

【0022】本発明の血液系の疾患の診断薬または検査薬は、上記のいずれかの造血幹細胞増殖剤を含む。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明の実施においては、特に指示のない限り、当該分野で既知であるタンパク質の分離および分析法、組換えDNA技術およびアッセイ方法が採用される。

【0024】I. 定義

以下に、本発明を説明する上で用いられる用語を説明する。

【0025】サイクロフィリンは、上述のように、当初、免疫抑制剤サイクロスポリンAに結合する蛋白質として単離されたポリペプチドであり、サイクロフィリンA、サイクロフィリンB、およびサイクロフィリンCが知られている。本発明において、用語「サイクロフィリン」は、これらの特定のポリペプチドに限定されず、こ

れらのポリペプチドのいずれかに対してアミノ酸配列における実質的な相同性を有するポリペプチド、およびこれらのポリペプチドのいずれかの修飾体もまた含んでいる。相同なポリペプチドの例として、種変異体、および対立遺伝子変異体がある。

【0026】ヒト由来のサイクロフィリンAは、配列表の配列番号3のアミノ酸配列を含む。マウス由来のサイクロフィリンAの場合、配列表の配列番号4のアミノ酸配列を含む。

【0027】ヒト由来のサイクロフィリンBは、配列表の配列番号1のアミノ酸配列を含む。マウス由来のサイクロフィリンBの場合、配列表の配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0028】ヒト由来のサイクロフィリンCは、配列表の配列番号9のアミノ酸配列を含む。マウス由来のサイクロフィリンCの場合、配列表の配列番号10のアミノ酸配列を含む。

【0029】ヒトの疾患または治療の目的において、およびヒトの造血幹細胞の増殖においてヒト由来のポリペプチドが好ましいことは明らかである。しかし、他の哺乳動物由来の相同なポリペプチドもまた目的に応じて使用可能である。さらに、他の哺乳動物由来のポリペプチドとの比較は、ヒト由来のポリペプチドの所望の活性が保持された改変体を得るうえで重要である。

【0030】本発明に用いられるサイクロフィリンは、上記の特定の配列によって必ずしも限定されることはなく、これらの配列のいずれかに対して、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ所望の活性が保持された相同なポリペプチド（すなわち、サイクロフィリンの相同体）も対象として含まれる。ここで、「数個」までのアミノ酸の変異とは、所望の活性が得られる限り、必ずしも特定の上限値に束縛されることを意図しないが、代表的には約60個以下、好ましくは約40個以下、より好ましくは約20個以下の範囲であり得る。アミノ酸の付加の例には、N末端の1個のMet残基の付加（これはM型のサイクロフィリンを与える）が含まれる。

【0031】アミノ酸の保存的置換は、相同なポリペプチドを得るための好ましい手段のひとつである。保存的置換は、代表的には以下のグループ内での置換を包含する：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

【0032】2つのアミノ酸配列の間の配列同一性（相同性）は、必要であればギャップを導入して、残基の適合を最適化することにより決定される。ヒトのサイクロフィリンに実質的なアミノ酸配列相同性を有するポリペプチドは、ヒトのサイクロフィリンのいずれかのアミノ酸配列と比較して、代表的には少なくとも約60%、好

ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、さらに好ましくは少なくとも約90%以上の相同性を有するポリペプチドとして表され得る。相同性決定のためのソフトウェアは、容易に入手可能であり、例えば、Gene Works (Intelligent Genetics Inc.) などが入手可能である。

【0033】本発明に用いられるサイクロフィリンの修飾体としては、上記の配列と同一または相同な配列を有するポリペプチドであって、そのアミノ酸側鎖またはアミノ末端またはカルボキシル末端が修飾され、かつ所望の活性が保持されたポリペプチドが含まれる。サイクロフィリンの相同体と修飾体とを総称して、機能的等価体ともいう。上記の修飾体の例として、アミノ末端がアシル化（例えば、アセチル化）されたポリペプチド、およびカルボキシル末端がアミド化またはエステル化されたペプチドが挙げられる。好ましい修飾体としては、配列表の配列番号3および配列番号4のアミノ末端のバリンのアミノ基がアセチル化されたポリペプチドが挙げられる。より好ましくは、配列番号3に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0034】本発明において「造血幹細胞増殖活性を有する」とは、定義上、下記の実施例14と実質的に同一の条件（サイクロフィリンBの添加濃度は20 ng/mlとする）で測定したとき、CD34+CD38-細胞数が実施例14の対照区に示された細胞数よりも多いこと、代表的には約110%以上、好ましくは約200%以上であることをいう。

【0035】「造血幹細胞」とは、赤血球、白血球、巨核球などの骨髄細胞のみならず、T細胞、B細胞などのリンパ系を含めた全ての血液系への分化能を有する多能性の細胞であって、自己増殖可能な細胞をいう。造血幹細胞は、CD34抗原が陽性でかつCD38抗原が陰性であることにより特徴付けられる。「造血前駆細胞」とは、血液系の特定の細胞系列への分化が決定付けられているが、分裂により自己増殖可能な細胞をいう。造血前駆細胞は、CD34抗原とCD38抗原がいずれも陽性であることにより特徴付けられる。

【0036】「組織幹細胞」とは、分裂に伴って自己再生能を示すとともに、同時に性質の異なる細胞を生じる分化能を有する細胞をいい、造血幹細胞、表皮基底膜の幹細胞、小腸粘膜上皮の幹細胞、神経系幹細胞など、あらゆる種類の幹細胞を含む。「組織前駆細胞」とは、特定の組織に分化および成熟する前段階の細胞をいう。

【0037】II. 造血幹細胞増殖活性を有するサイクロフィリン

本発明においては、サイクロフィリンは、造血幹細胞増殖剤の有効成分として利用される。サイクロフィリンは、天然の供給源から単離されたもの、組換えDNA技術を使用して産生したもの、または化学合成したものであり得る。

【0038】サイクロフィリンを天然の供給源から単離する場合、例えば、以下のようにして精製し得る。まず、骨髄腫細胞（例えば、P3-NS1/1-Ag4-1（略称：NS-1）細胞）を培養し、得られる培養上清から造血幹細胞増殖活性蛋白質を分離および精製する。

【0039】「骨髄腫細胞」とは、永久増殖能を有する、ガン化した株化細胞である。骨髄腫細胞は、種々の用途が知られており、例えば、ケーラーおよびミルシュタインは、マウス由来の骨髄腫細胞であるP3-X63-Ag8（略称X63）細胞を、ヒツジ赤血球細胞で感作したマウス脾臓由来のリンパ球と細胞融合し、B細胞ハイブリドーマを作製した（ケーラーら、Nature、256:495（1975））。X63細胞は、BALB/cマウス由来のIgG1カップ鎖産生骨髄腫細胞から、8-アザグアニン耐性であり、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地では増殖できない細胞集団を、クローニングにより選択して得られた細胞株である。NS-1細胞は、X63細胞由来の骨髄腫細胞で、IgG1カップ鎖のみを合成するが、分泌はしないことが知られている（ケーラーら、Eur. J. Immunology、6:511（1976））。

【0040】本発明者らは、このNS-1細胞培養上清に、驚くべきことに、造血幹細胞増殖活性が存在することを見出した。従って、本発明における造血幹細胞増殖活性因子は、NS-1細胞の培養上清、または同様な活性を示す他の骨髄腫細胞の培養上清から単離することができる。骨髄腫細胞培養上清に見出された造血幹細胞増殖活性蛋白質の分離精製は、造血幹細胞増殖活性を示す骨髄腫細胞培養上清を大量に調製することから始める。細胞の培養は、通常の株化細胞の培養方法に準じればよい。例えば、適当な比率の牛胎児血清（FCS）を含有する動物細胞培養用培地中で、37℃に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。

【0041】培養上清から蛋白質を分離および精製するためには、夾雑蛋白質をできるだけ減少させる必要がある。そのために、最も造血幹細胞増殖活性蛋白質の含有量が増える直前期に、培地を無血清培地に交換して、培養を継続し、その後培養上清を回収することが好ましい。回収した培養上清をフィルターに通して、細胞残渣を除くことができる。

【0042】得られた培養上清から、造血幹細胞増殖活性蛋白質を分離および精製するためには、通常の蛋白質の分離精製方法を用いることができる。培養上清を濃縮するためには、限外ろ過膜を用い得る。濃縮した培養上清を、HPLCを用いたゲルろ過カラムにアプライし、造血幹細胞増殖活性を有する画分を回収する。得られた活性画分を逆相HPLCカラムに供する。溶出したものの中から、造血幹細胞増殖活性を有する画分を回収す

る。こうして得られた画分は充分な純度を有し、さらなる精製を行わずにこのままプロテインシークエンサーによるアミノ酸配列分析に供することができる。アミノ末端がエンドマン分解できない構造を有する場合、トリプシンなどの蛋白質分解酵素によるペプチドマップを作製して、解析することができる。こうして、骨髓腫細胞培養上清に見出される造血幹細胞増殖活性蛋白質を同定することができる。

【0043】サイクロフィリンを組換えDNA技術を使用して産生する場合、目的のポリペプチドをコードするDNA配列が、種々の組換え系を用いて発現される。発現ベクターの構築および適切なDNA配列を有する形質転換体の作製は、当該技術分野で公知の方法によって実施される。発現は、原核生物系または真核生物系で実施され得る。

【0044】サイクロフィリンA、BおよびCをコードするDNA配列は、当該分野で公知であり、これらの配列を含むポリヌクレオチドは容易に入手可能である。サイクロフィリンの相同体をコードするDNA配列は、例えば、常法に従ってcDNAライブラリーなどからスクリーニングすることができる。

【0045】原核生物宿主としては、*E. coli*、バチルス属菌、およびその他のバクテリアが用いられる。そのような原核生物には、複製部位と宿主に適合する制御配列とを含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、*E. coli*は、典型的には、*E. coli*由来のプラスミドである、pBR322の誘導体を用いて形質転換される。ここでの制御配列とは、転写開始のためのプロモーター、必要に応じてオペレーター、およびリボソーム結合部位配列を含むと定義される。この制御配列には、 $\beta$ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、トリプトファンプロモーター系、および入フェージ由来の $P_L$ プロモーターおよびN遺伝子リボソーム結合部位のような一般的に用いられているものが包含される。

【0046】真核生物宿主としては、例えば酵母および哺乳動物細胞が用いられ得る。このような真核生物には、複製部位と宿主に適合する制御配列とを含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、酵母は、pYEUra3 (Clontech) を用いて形質転換される。その他に、真核生物宿主で有用なプロモーターには、例えば糖分解酵素を合成するためのプロモーター（例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター）；エノラーゼ遺伝子由来のプロモーター；YEp13から得られたLeu2遺伝子由来のプロモーター；メタロチオネイン由来のプロモーター；SV40由来の初期または後期プロモーター、ポリオーマウイルス、アデノウイルスII、ウシ乳頭腫ウイルス、およびトリ肉腫ウイルス由来のプロモーターのような他のウイルスプロモーターが包含される。宿主細胞と適切なプロモータ

ーとの組合せは当業者に公知であり、必要に応じて適切に選択され得る。

【0047】発現ベクターを適合性の宿主細胞に導入することによって形質転換体を得られる。この形質転換体を適切な条件で培養することにより、所望のサイクロフィリンを得ることができる。サイクロフィリンの修飾体は、宿主細胞中での発現後修飾の結果として得られる場合がある。所望により、単離精製したサイクロフィリンを公知の化学合成技術を利用して修飾体に変換することもできる。

【0048】大腸菌によるヒトサイクロフィリンBの生産の例を説明する。最初に、ヒトサイクロフィリンBのcDNAの5'側が制限酵素NdeI部位に、3'側が制限酵素EcoRI部位になるように設計した合成プライマーを用いて、ヒトサイクロフィリンBのcDNAを鋳型にしてPCRを行い、ヒトサイクロフィリンBのcDNA（制限酵素NdeI-EcoRI断片）を増幅する。増幅したcDNAを大腸菌発現ベクターpET11b（制限酵素NdeIおよびEcoRIで処理したもの）にライゲーションすることにより、ヒトサイクロフィリンB大腸菌発現ベクターを作製する。作製された発現ベクターを、大腸菌コンピテントセルBL21 (DE3) にトランスフォーメーションして、大腸菌トランスフォーマントを取得する。

【0049】次にこの大腸菌トランスフォーマントから、ヒトサイクロフィリンBを、例えば以下のようにして生産させる。まず、大腸菌トランスフォーマントを、アンピシリンを含むLB液体培地に植菌して、37℃にて培養する。600nmの吸光度が約0.7になったら、イソプロピル-1-チオベーター-D-ガラクトシド (IPTG) を0.1~1.0mM、好ましくは0.4mM添加して、37℃にて、さらに2時間培養した後、大腸菌を遠心分離にて集菌する。

【0050】集菌された菌体をリシスバッファー（組成：20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA 2ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド、1μg/ml アプロチニン、1μg/ml ロイペプチン、および1μg/ml ペプスタチン）で懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎し、菌体破碎液を得る。菌体破碎液を遠心分離し、得られる上清に硫酸アンモニウムを40%飽和となるように添加し、不要なタンパク質を沈澱させる。沈澱後、遠心分離を行ない、得られる上清をTris-HCl (pH8.0) に透析する。この透析した溶液をTSK-gel DEAE-5PWに供し、20mM Tris-HCl (pH8.0) でNaCl濃度を0から1mMに上げるグラジエントで溶出し、サイクロフィリンBの画分を集める。集めた画分を、限外ろ過装置（分画分子量10,000）で濃縮する。この濃縮液をTSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>に供し、Ca<sup>2+</sup>

および $Mg^{2+}$ を含まないリン酸緩衝化生理食塩水(PBS(-))で精製を行う。精製されたサイクロフィリンBの画分を再度TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>によりさらに精製し、ヒトサイクロフィリンB蛋白質の高純度標品を得ることができる。

【0051】ここではヒトサイクロフィリンの生産の例を挙げたが、マウスのサイクロフィリンBなどについてもヒトと同様にして作製できる。

【0052】サイクロフィリンの化学合成は、当該技術分野で公知の方法で行われ得る。例えば、ペプチド合成機による固相法で合成され得る。例えば、ベンズヒドリルアミンレジンを用いて、ペプチド合成機にて、C末端アミノ酸から順次N末端アミノ酸まで標準的なDCC/HOBt法で縮合させ、得られたペプチドレジンから標準的な開裂法(トリフルオロメタンスルホン酸法)で生成ペプチドを切り出すことによって、C末端がアミド化されたペプチドを作製し得る。

【0053】作製したサイクロフィリンが正しい分子構造を取れているかどうかは、サイクロフィリンのペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を測定することにより判断できる。シス-N-サクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-p-ニトロアニリジン(cis-N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidine)を最終50 $\mu$ M、Hepesバッファー(pH8.0)を40mM、Triton-X100を0.015%(w/v)に加えて、サイクロフィリンを50nM添加し、10℃でインキュベーションし、これに200 $\mu$ Mキモトリプシンを加えてすばやく分光光度計にて、390nmの吸収を測定することにより活性を測定して判断できる。

【0054】III. 造血幹細胞増殖活性の確認  
次にサイクロフィリンの造血幹細胞増殖活性の確認の方法の例を説明する。

【0055】臍帯血から調製した造血幹細胞(CD34+CD38-細胞)を、マイクロタイプレートにプレーティングする。造血幹細胞の増殖に使用する培地としては、試験区では、15%FCS-RPMI 1640に、サイトカインであるSCFおよびIL3を添加した培地(SCF/IL3培地)を用意し、これに造血幹細胞活性を検定しようとする目的のポリペプチド(例えば、ヒトサイクロフィリンB)を含有するサンプルを添加した培地である。対照区では、目的のポリペプチドを含有する上記サンプルの代わりに、2%FCS-RPMI 1640をSCF/IL3培地に加えた培地を用いる。これらを約37℃で10~20日間程度培養した後、生細胞数をトリバンプルー法で測定し、試験区と対照区での生細胞数を比較することにより、目的ポリペプチドの造血幹細胞増殖活性が確認できる。

【0056】他の方法では、次のように造血幹細胞増殖活性が測定され得る。臍帯血から調製した造血幹細胞を

プレーティングする。造血幹細胞の増殖に使用する培地としては、試験区では、15%FCS-RPMI 1640に、サイトカインであるSCF、IL6、およびIL3を添加した培地(SCF/IL6/IL3培地)を用意し、これに造血幹細胞活性を検定しようとする目的のポリペプチド(例えば、ヒトサイクロフィリンB、IL7、F1t-3リガンド、およびNS-1培養上清10倍濃縮溶液)を含有するサンプルを添加した培地である。対照区では、目的のポリペプチドを含有する上記サンプルの代わりに、2%FCS-RPMI 1640をSCF/IL6/IL3培地に加えた培地を用いる。約37℃で20~35日間培養した後、生細胞数をトリバンプルー法で測定し、試験区と対照区での生細胞数を比較することにより、目的のポリペプチドの造血幹細胞増殖活性が確認できる。

【0057】別の方法では、臍帯血から調製した造血幹細胞をプレーティングする。造血幹細胞の増殖に使用する培地として、試験区では、15%FCS-RPMI 1640に、サイトカインであるSCF、IL6、およびIL3を添加した培地(SCF/IL6/IL3培地)を用意し、これを造血幹細胞活性を検定しようとする目的のポリペプチド(例えば、大腸菌型ヒトサイクロフィリンB、大腸菌型マウスサイクロフィリンBそして大腸菌型ヒトサイクロフィリンAを含有するサンプルを添加した培地である。対照区では、目的のポリペプチドを含有する上記サンプルの代わりに、2%FCS-IMDM(イスコフ(Iscove's)モディファイドダルベッコ培地)をSCF/IL6/IL3培地に加えた培地を用いる。約37℃で10~20日間程度培養した後、細胞にCD34(FITC)抗体処理を行い、各一定時間FACSscanにて細胞の取り込みを行いCD34+細胞比率を求める。また、トリバンプルー法で生細胞数を測定し、生細胞数にCD34+細胞比率を乗じて算出することにより、CD34陽性細胞数を求める。このようにして、目的ポリペプチドの造血幹細胞増殖活性の確認ができる。

【0058】IV. 造血幹細胞増殖剤およびその利用  
本発明の造血幹細胞増殖剤は、造血幹細胞増殖活性を有するサイクロフィリンと、その活性を実質的に阻害しない任意の媒体とを含有する組成物として提供される。従って、上記のサイクロフィリンを含有する培養上清自体も、造血幹細胞増殖剤の定義に含まれる。ここで「サイクロフィリン」は広義に用いられ、サイクロフィリンA、B、およびCのほか、上述したサイクロフィリンの相同体および修飾体を含む意である。ヒトへの投与のための造血幹細胞増殖剤は、代表的には、有効量のサイクロフィリンに加えて、当業者に公知の任意の薬学的に受容可能な賦形剤を含有し得る。賦形剤の例としては、乳糖、コーンスターチ、ステアリン酸マグネシウム、ミョウバンなどが挙げられる。

【0059】本発明の造血幹細胞増殖剤は、当該分野で公知の方法に従って調製され得る。

【0060】本発明の造血幹細胞増殖剤は、任意の形状であり得る。本発明の造血幹細胞増殖剤は、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤のような固体；または水溶液および懸濁液のような液体であり得る。本発明の造血幹細胞増殖剤を錠剤として経口投与する場合、通常、乳糖、コーンスターチ、およびステアリン酸マグネシウムのような賦形剤が使用され得る。本発明の造血幹細胞増殖剤をカプセル剤として経口投与する場合、通常、乳糖および乾燥コーンスターチのような賦形剤が使用され得る。水性懸濁液として経口投与するためには、サイクロフィリンを乳濁液または懸濁液と組み合わせて使用し得る。水性懸濁液は、必要に応じて、甘味剤および香料を含有し得る。本発明の造血幹細胞増殖剤を筋肉内、腹腔内、皮下、および静脈内注射する場合は、滅菌した溶液にサイクロフィリンを溶解させて緩衝液を調製し、pHを適切な値に調節する。本発明の造血幹細胞増殖剤を静脈内投与する場合は、この増殖剤は等張であることが好ましい。

【0061】本発明の造血幹細胞増殖剤を用いることにより、造血幹細胞または造血前駆細胞を含む組織幹細胞または組織前駆細胞を大量に増殖させることが可能である。例えば、本発明の造血幹細胞増殖剤を用いて、インビトロにおいて造血幹細胞または造血前駆細胞を増殖させることにより、血球を大量生産することができる。造血幹細胞増殖剤の有効量ならびに血球の生産および回収の条件などは、当業者により適宜選択され得る。

【0062】さらに、本発明の造血幹細胞増殖剤は、免疫抑制障害などの各種の造血器官疾患、ならびに癌の放射線治療および化学療法による造血不全のような、血球の増加が所望される患者の治療に用いることができる。治療用途において、本発明の造血幹細胞増殖剤は、Remington's Pharmaceuticals, Mack Publishing社 (Easton, PA) に記載されているような従来のポリペプチドの処方物の形で投与され得る。例えば、本発明の造血幹細胞増殖剤は、経口投与、静脈投与、筋肉注射、腹腔内注射、および皮下注射のような非経口投与により投与され得る。これらのポリペプチドを羊水中へ補充することも可能である。好ましくは、これらのポリペプチドは、注射によって投与され得る。

【0063】本発明の造血幹細胞増殖剤を、ヒトに投与する場合、1日あたりの用量は、通常、患者の症状、重篤度、感受性に対する個体差、体重、年齢などを考慮して、当業者によって適切に決定され得る。本発明の造血幹細胞増殖剤は、1日1回投与されてもよいし、1日数回に分けて投与されてもよい。

【0064】遺伝子治療においては、目的の遺伝子の導入効率は、遺伝子を細胞に導入工程で、どれだけ多数の

細胞が分裂を行なっているかに左右されることが知られている。従って、本発明の造血幹細胞増殖剤を用いて造血幹細胞または造血前駆細胞を増殖させつつ遺伝子を導入することにより、非常に高い遺伝子導入効率を得ることができる。

【0065】さらに、本発明の造血幹細胞増殖剤は、そのまま血液系の疾患（例えば、白血病、骨髄腫、貧血など）の診断薬および検査薬として用いることができる。

【0066】

【実施例】以下、本発明における造血幹細胞増殖因子としてのサイクロフィリンについてさらに具体的に説明する。本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

【0067】（実施例1：ヒト臍帯血からの、造血幹細胞の調製）産婦人科からインフォームドコンセントにて供与された、ヒト臍帯血（抗凝固剤としてヘパリンを用いたもの約50ml）からフィコール法（アマシャムファルマシアバイオテク社製、フィコールバックを用いた）にて、単核球画分を調製し、凍結保存した。これをアッセイ開始時に凍結融解後、15%FCS-RPMI 1640（株式会社日研生物医学研究所製）にて洗浄し、細胞に、CD34（FITC）、CD38（PE）各抗体処理を行い、FACSstar（ベクトンディッキンソン社製）にて、造血幹細胞CD34陽性CD38陰性（以下CD34+CD38-と表す）細胞を分取した。

【0068】（実施例2：ヒト臍帯血の造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系の構築）実施例1で分取したヒト臍帯血のCD34+CD38-細胞を、96ウェルU型プレート（コースター社製）にプレーティングした（50細胞/100μl/ウェル）。用いた培地は、15%FCS-RPMI 1640に、サイトカインであるSCF（25ng/ml）、IL6（20ng/ml）、およびIL3（20ng/ml）を添加したものであり、さらに、造血幹細胞増殖活性について測定しようとするサンプル20μl/ウェルを添加した。

【0069】37℃で13～32日間液体培養した後、生細胞数をトリパンブルー法（トリパンブルーは大日本製薬社のものを用いた）にて測定した。細胞のカウントには血球計算盤を用いた。

【0070】CD34+細胞数およびCD34+CD38-細胞数は、以下の通りに算出した。まず、液体培養後の細胞をCD34（FITC）抗体（イムノテック社製）およびCD38（PE）抗体（イムノテック社製）（細胞10<sup>5</sup>個に対して抗体50ng）で染色した。染色された細胞を、PBS（-）溶液（FCS1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む）で2回洗浄した後、ヨウ化プロピジウム（シグマアルドリッチジャパン株式会社製）を最終濃度10μg/mlになるように加えて細



胞核を染色した。染色された細胞を、FACScan (ベクトンディッキンソン社製) で解析して、CD34+細胞比率およびCD34+CD38-細胞比率を求め、生細胞数にその比率を乗じることにより、CD34+細胞数およびCD34CD38-細胞数を算出した。

【0071】(実施例3: マウス骨髓腫細胞培養およびその培養上清の調製) マウス骨髓腫細胞(NS-1)を、 $1.0 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度になるように、15%FCS-RPMI 1640培地15mlに懸濁し、カルチャーディッシュ(グライナー社製)(直径10cm)に入れ、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで、37℃で培養を開始した。培養0、1、2、3、4、5、6、7および8日目に培養上清を回収し、0.22μmのフィルターを通過した上清を集めた。

【0072】(実施例4: NS-1細胞増殖曲線の作製) NS-1細胞培養0、1、2、3、4、5、6、7および8日目に、生細胞数および死細胞数をトリパンブルー法にて測定した。測定の結果、生細胞濃度は、それぞれ $1 \times 10^5$ 個/ml、 $4 \times 10^5$ 個/ml、 $10 \times 10^5$ 個/ml、 $17 \times 10^5$ 個/ml、 $18 \times 10^5$ 個/ml、 $14 \times 10^5$ 個/ml、 $10 \times 10^5$ 個/ml、 $5 \times 10^5$ 個/ml、 $2 \times 10^5$ 個/mlであった。死細胞濃度は、 $0.05 \times 10^5$ 個/ml、 $0.1 \times 10^5$ 個/ml、 $0.5 \times 10^5$ 個/ml、 $1 \times 10^5$ 個/ml、 $4 \times 10^5$ 個/ml、 $10 \times 10^5$ 個/ml、 $13 \times 10^5$ 個/ml、 $17 \times 10^5$ 個/ml、 $20 \times 10^5$ 個/mlであった。この結果、培養4日目に生細胞数が最大になることがわかった。

【0073】(実施例5: NS-1細胞培養上清回収時期の決定) 上記実施例3でNS-1細胞を培養して、培養0、1、2、3、4、5、6、7および8日目に回収して得た培養上清を、実施例2で構築したヒト臍帯血造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系を用いて評価を行った。各培養上清を96穴U型ウェルに20μlずつ添加した。CD34+細胞数は、培養4、5、6、7および8日目に回収した上清についてそれぞれ、362個、550個、153個、115個および93個であった。その結果、培養5日目の上清に最も高い造血幹細胞増殖活性が存在することがわかった。

【0074】(実施例6: NS-1細胞培養上清の造血幹細胞増殖活性の濃度依存性についての検討) 実施例3で回収したNS-1細胞培養上清の造血幹細胞増殖活性の濃度依存性について検討した。ヒト臍帯血造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系を用いて、培養25日目のNS-1細胞培養上清を、原液のまま、2倍希釈、4倍希釈、8倍希釈、16倍希釈、32倍希釈、64倍希釈、128倍希釈および256倍希釈して添加して造血幹細胞増殖活性を評価した。CD34+細胞数はそれぞれ、238個、144個、74個、104個、45個、1個、0個、11個および10個であった。CD

34+CD38-細胞数はそれぞれ、107個、36個、44個、37個、17個、1個、0個、2個および1個であった。このように、造血幹細胞の増殖はNS-1細胞培養上清の濃度にほぼ依存していた。

【0075】(実施例7: NS-1細胞培養上清の大量調製) NS-1細胞を $1.0 \times 10^5$ /mlの濃度になるように、15%FCS-RPMI 1640培地50mlに懸濁し、カルチャーフラスコ(グライナー社製、150cm<sup>2</sup>)に入れた。5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで、37℃の条件で培養を開始し、培養後5日目の培養上清を回収し、0.22μmのフィルターを通過した上清を集めた。合計3,620mlの培養上清を回収した。

【0076】(実施例8: NS-1細胞培養上清のゲルろ過による精製) 実施例7で回収したNS-1細胞培養上清15mlを、分画分子量10,000の限外ろ過フィルター(ゲルマンサイエンシズ社製)で1mlに濃縮後、全量をSephacryl S-200カラム(アマシャムファルマシアバイオテック社製)(直径10mm、高さ19.1cm)にアプライした。平衡化緩衝液には、RPMI 1640培地(日水製薬製)を用いて、溶出画分を集めた。

【0077】溶出画分を、実施例2で構築したヒト臍帯血造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系で造血幹細胞増殖活性について評価したところ、分子量2万付近の画分に活性が認められた。

【0078】5日間37℃で保存した15%FCS-RPMI 1640培地を同様にしてSephacryl S-200カラムでゲルろ過したものを対照にして、同じ造血幹細胞増殖因子検出系で評価したが、対照では造血幹細胞増殖活性はほとんど認められなかった。

【0079】以上から、分子量2万付近の培養上清画分に造血幹細胞増殖活性因子が存在することがわかった。

【0080】(実施例9: NS-1細胞培養上清のゲルろ過画分の逆相HPLCによる精製) 実施例8で得られたゲルろ過での活性画分を逆相HPLCに供した。逆相HPLCカラムとして、YMC-Pack PROTEIN-RP(株式会社ワイエムシ製、長さ250mm、内径4.6mm)を用い、HPLC装置は島津製作所製LC-10Aを使った。溶出はTFA-CH<sub>3</sub>CNの系で行った。すなわちA液には0.1%TFA(pH2.0)、B液には80%CH<sub>3</sub>CN-0.1%TFA(pH2.0)を用いて、最初の5分間はB液の濃度を0%、次の70分間でB液の濃度を0%から70%に直線グラジエントで、次の10分間で70%から100%まで同様に直線グラジエントで溶出した。溶出画分を、ヒト臍帯血造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系で評価を行った(図1)。リテンション時間60分付近の画分および63分付近の画分に活性が認められた。

【0081】(実施例10: 無血清培養によるNS-1

細胞培養およびその培養上清の調製) 15%FCS含有培地よりも、より精製が容易な培養上清を作製するために、無血清培養によるNS-1細胞培養方法を確立した。NS-1細胞を $1 \times 10^5 / \text{ml}$ の濃度で15%FCS-RPMI 1640培地40mlで、直径14.5cmのディッシュ(グライナー社製)にて培養開始した。培養4日目に新しい15%FCS-RPMI 1640培地40mlに交換し、さらに1日培養した。次いで、PBS(-)で2回洗浄し、血清を含まないRPMI 1640培地40mlに移し、新しいディッシュで1日間培養した。次いで、培養物を0.22 $\mu\text{m}$ のフィルターを通し、細胞残渣を除去して、培養上清を回収した。回収した培養上清を、ヒト臍帯血造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系での評価に供して活性が存在することを確認した。

【0082】(実施例11: NS-1細胞無血清培養上清のゲルろ過による精製) 実施例10で回収したNS-1細胞無血清培養上清20mlを、分画分子量10,000の限外ろ過フィルター(ゲルマンサイエンシズ社製)で1/10に濃縮して得た濃縮培養上清2mlを、TSK gel G3000SW<sub>XL</sub> カラムにアプライした。平衡化緩衝液には、0.3M食塩を含む50mMリン酸緩衝液を用い、溶出画分を集めた。溶出画分を、ヒト臍帯血造血幹細胞を用いた造血幹細胞増殖因子検出系で評価を行ったところ、分子量2万付近の画分に活性が認められた。

【0083】(実施例12: NS-1細胞無血清培養上清のゲルろ過画分の逆相HPLCによる精製) 実施例11で得られたゲルろ過での活性画分14mlを逆相HPLCに供した。逆相HPLCカラムとして、YMC-Pack PROTEIN-RP(株式会社ワイエムシ製、長さ250mm、内径4.6mm)を用い、HPLC装置は島津製作所製LC-10Aを使った。溶出はTFA-CH<sub>3</sub>CNの系で行った。すなわちA液には0.1%TFA(pH2.0)、B液には80%CH<sub>3</sub>CN-0.1%TFA(pH2.0)を用いて、最初の15分間はB液の濃度を0%、次の70分間でB液の濃度を0%から70%に直線グラジエントで、次の10分間で70%から100%まで同様に直線グラジエントで溶出した(図2)。

【0084】CH<sub>3</sub>CN濃度が47%付近のピーク(リテンション時間が71分、72分、および74分の合計3つ)を回収して、再度同じカラムでリクロマトグラフィーを行い同様に精製した。

【0085】(実施例13: 精製サンプルのアミノ末端アミノ酸配列確認) 上記の実施例12においてYMC-Pack PROTEIN-RPのリクロマトグラフィーで精製して得られた3つのサンプルを、プロテインシーケンサー(Applied Biosystems Procise Sequencer: Model

492) にアプライして、分析した。

【0086】リテンション時間が71分のサンプルは、25アミノ酸残基のアミノ末端を分析したところ、マウスサイクロフィリンBに一致した。リテンション時間が72分のサンプルは、マウスサイクロフィリンAに一致した。リテンション時間が74分のサンプルは、エドマン分解できない構造と思われた。

【0087】次いで、上記の実施例12において得られた3つのサンプルを、TPCK-トリプシンを用いてペプチドマップを作製して分析したところ、リテンション時間が71分のサンプルは、マウスサイクロフィリンBに一致した。またリテンション時間が72分のサンプルも、マウスサイクロフィリンAに一致した。リテンション時間が74分のサンプルは、アミノ末端のペプチドがエドマン分解できなかったが、その他のトリプシンペプチドはマウスサイクロフィリンAに一致した。そこでアミノ末端のペプチド15 $\mu\text{l}$ (100pmol)をアミノ酸分析した。

【0088】試料をガラス試験管に採取し、乾固後、20 $\mu\text{l}$ の6N塩酸を添加、真空封管下、135℃で3時間加水分解した。試料を乾固後、再び75 $\mu\text{l}$ の精製水に溶解し、内50 $\mu\text{l}$ を、条件として、特殊アミノ酸分析法/ニンヒドリン発色、装置は日立アミノ酸分析計L-8500型で分析した。マウスサイクロフィリンAのアミノ末端のペプチドと比較すると、全く同じ値が得られたため、アミノ酸配列上はマウスサイクロフィリンAと同様であると考えられた。

【0089】次にアミノ末端のペプチド1 $\mu\text{l}$ をMALDI-TOF-MSで分析した。試料1 $\mu\text{l}$ に内標としてサブスタンスP(分子量1348.6)を添加し、サンプルスライドに添加した。乾固後、1 $\mu\text{l}$ のマトリックス(アルファシアノー1-ヒドロキシシナミックアシッド 10mg/ml)を添加して、以下の条件で測定した。MS測定条件は、質量分析装置として、KOMPACT MALDI II(島津製作所/KRATOS)、レーザー光波長を337nm(窒素レーザー)で測定した。結果はアミノ酸組成から計算したペプチドの分子量(理論値)(2,005)と、得られたマスペクトルの平均値(2,048)との差が43であることから、アミノ末端ブロック基は分子量が43に相当するアセチル基であると推定された。以下このアミノ末端のバリンがアセチル化されたマウスサイクロフィリンAを、マウス修飾型サイクロフィリンAと称す。

【0090】(実施例14: 精製サンプルの造血幹細胞増殖活性確認) 未熟な造血幹細胞であるCD34+CD38-細胞数の増加を指標に、実施例12で得た3つのサンプルの活性を調べた。すなわち、YMC-Pack PROTEIN-RPでリクロマトグラフィーを行い精製した、マウスサイクロフィリンB、マウス修飾型サイクロフィリンAおよびマウスサイクロフィリンAの活

性を実施例2で構築した造血幹細胞増殖因子検出系を用いて調べた。対照としては、2%FCS-RPMI 1640を用いた。比較する、既知の造血幹細胞増殖活性を有するサイトカインとして、G-CSF、GM-CSF、LIFおよびIL7を用いた。

【0091】それぞれ、96穴ウエルの5ウエルで培養した細胞を混合して、FACScanにて解析した。実験は4回、異なるドナーの臍帯血の幹細胞を用いて行った。添加したサイトカインの濃度は、マウスサイクロフィリンB以外はすべて、最終20ng/mlになるようにした。マウスサイクロフィリンBの濃度は、正確には決定されなかったが、約20~100ng/ml程度の範囲内の濃度であった。

【0092】結果は、マウスサイクロフィリンB、マウス修飾型サイクロフィリンAおよびマウスサイクロフィリンAの造血幹細胞増殖活性は既存のサイトカインに比べて高かった。代表的な結果を図3に示す。

【0093】(実施例15: ヒトサイクロフィリンB遺伝子クローニングおよびその大腸菌用発現ベクターの作製) ヒトcDNAライブラリー(ヒト胸腺、プラスミド型、宝酒造株式会社製)をテンプレートにして、ヒトサイクロフィリンcDNAの5' サイトが制限酵素Nde I (宝酒造株式会社製)に、そして3' サイトが制限酵素EcoRIになるように設計した合成プライマーを用いて、常法通りPCRを行い、ヒトサイクロフィリンcDNA (Nde I-EcoRI断片)を作製した。このPCRに用いた合成プライマーB1-1の配列は、配列番号5で表される。合成プライマーB1-2の配列は、配列番号6で表される。

【0094】PCRは、これらプライマーを10μM分5μlずつ添加、dNTP混合物(2.5mM)10μl、ヒトcDNAライブラリー(ヒト胸腺)100分の1量分、エクスタック(宝酒造株式会社製)0.5μl、エクスタック10倍濃縮バッファー10μl、滅菌水59.5μl、合計100μlの系で、ミネラルオイルを添加して、95℃で30秒間; 55℃で30秒間; および72℃で30秒間のサイクルを30サイクル行った。PCRの終了後、ミネラルオイルを取らないようにして、DNA溶液を回収した。回収したDNA溶液を、クロロホルム抽出、エタノール沈殿による精製を行い、制限酵素EcoRIおよび制限酵素Nde I (宝酒造株式会社製)で処理した後、0.7%アガロースゲル電気泳動によりDNAを切り出し、精製した。

【0095】大腸菌用発現ベクターはpET発現系のpET11b (ストラタジーン社製)を用いた。2μl (2μg)のpET11bを制限酵素EcoRIおよび制限酵素Nde Iで、37℃にて16時間処理した。酵素処理したpET11bを含むサンプルを、0.9%アガロースゲル電気泳動にて精製した。

【0096】この制限酵素EcoRIおよび制限酵素N

de Iで切断した精製されたpET11bに、上記のPCRで作製したヒトサイクロフィリンcDNA (Nde I-EcoRI断片) およびT4 DNAリガーゼ(宝酒造株式会社製)を加え、16℃にて16時間処理し、ライゲーションを行なった。ライゲーションした処理サンプル2μlに大腸菌コンピテントセルBL21 (DE3) (ストラタジーン社製)30μlを加え、氷水上に30分間放置し、42℃で60秒間処理した後、ただちに氷水上に5分間放置した。これにSOC培地(トリプトン20g、イーストエキストラクト5g、NaCl 0.585g、KCl 0.186g、MgCl<sub>2</sub> 10mM、MgSO<sub>4</sub> 10mMに水を加えて溶解し合計1Lとし、これに2Mグルコースを10ml添加した)900μlを加え、37℃、1時間振盪培養した後、アンピシリンナトリウム(和光純薬工業株式会社製)100μg/mlを含むLBアガープレートにプレーティングした。次いで、37℃にて16時間培養し、コロニーを得、トランスフォーマント(発現ベクターpET11Hu1-1を含有する)を取得した。

【0097】(実施例16: マウスサイクロフィリンB遺伝子クローニングおよびその大腸菌用発現ベクターの作製) マウスcDNAライブラリー(マウス胸腺、プラスミド型、宝酒造株式会社製)をテンプレートにして、マウスサイクロフィリンcDNAの5' サイトが制限酵素Nde I (宝酒造株式会社製)に、そして3' サイトが制限酵素EcoRIになるように設計した合成プライマーを用いて常法通りPCRを行ない、マウスサイクロフィリンcDNA (Nde I-EcoRI断片)を作製した。このPCRに用いた合成プライマーB2-1の配列は、配列番号7で表される。合成プライマーB2-2の配列は、配列番号8で表される。

【0098】PCRは、これらプライマーを10μM分5μlずつ添加、dNTP混合物(2.5mM)10μl、マウスcDNAライブラリー(マウス胸腺)100分の1量分、エクスタック(宝酒造株式会社製)0.5μl、エクスタック10倍濃縮バッファー10μl、滅菌水59.9μl、合計100μlの系で、ミネラルオイルを添加して30サイクルを行なった。PCRの終了後、ミネラルオイルを取らないようにして、DNA溶液を回収した。回収したDNA溶液を、クロロホルム抽出、エタノール沈殿による精製を行ない、制限酵素EcoRIおよび制限酵素Nde Iで処理した後、0.7%アガロースゲル電気泳動によりDNAを切り出し、精製した。

【0099】大腸菌用発現ベクターはpET発現系のpET11b (ストラタジーン社製)を用いた。上記実施例15で得た、制限酵素EcoRIおよび制限酵素Nde Iで切断した精製されたpET11bに、上記のPCRで作製したマウスサイクロフィリンcDNA (Nde I-EcoRI断片) およびT4 DNAリガーゼを加

え、16℃にて16時間処理し、ライゲーションを行なった。ライゲーションした処理サンプル2μlに大腸菌コンピテントセルBL21 (DE3) 30μlを加え、氷水上に30分間放置し、42℃で60秒間処理した後、ただちに氷水上に5分間放置した。これにSOC培地900μlを加え、37℃、1時間振盪培養した後、アンピシリンナトリウム (和光純薬工業株式会社製) 100μg/mlを含むLBアガープレートにプレーティングした。次いで、37℃にて16時間培養し、コロニーを得、トランスフォーマント (発現ベクターpET11MCPB1.1を含有する) を取得した。

【0100】 (実施例17: 大腸菌でのヒトサイクロフィリンBの作製) 上記実施例15で得られた、発現ベクターpET11Hu1-1を含有するトランスフォーマントを、100μg/mlのアンピシリンを含むLB培地100mlに植菌し、37℃でプレカルチャーした。翌日、この菌体含有液10mlを、500mlのLB培地 (100μg/mlのアンピシリンを含む) に植菌し、合計4L分を37℃で培養した。600nmの吸光度が約0.7になったときに、IPTG 0.4mMを添加し、37℃にてさらに2時間培養した後、細胞を遠心分離で回収した。

【0101】 培養液2L分をリシスバッファー (組成: 20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA 2ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1mM フェニルメチルсульホニルフルオリド、1μg/ml アプロチニン、1μg/ml ロイペプチン、および1μg/ml ペプスタチン) 60mlで懸濁した。この懸濁液に、ソニケーションをソニケーター島津製作所製 USP-600で、%デューティーサイクル60、アウトプット7にて、1分間を15回行い、細胞を破碎した。細胞破碎液を、12,000rpmで10分間、4℃で遠心分離し、上清を得た。その上清に40%飽和分の硫酸アンモニウムを添加した。4℃で1時間放置した後、12,000rpmで10分間遠心分離し、上清を得た。上清をTris-HCl (pH8.0) で4℃で透析した。この透析後の溶液をTSK-gel DEAE-5PWに供し、20mM Tris-HCl (pH8.0) でNaCl濃度を0から1mMに増加させるグラジエントで溶出した。

【0102】 サイクロフィリンBの画分を集め、PBS (-) を加えて、限外ろ過装置 (分画分子量10,000) で濃縮した。この濃縮液をTSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>に供し、PBS (-) バッファーで精製を行った。サイクロフィリンBの画分を再度TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>により精製した。得られたヒトサイクロフィリンBを、大腸菌型ヒトサイクロフィリンと称する。

【0103】 (実施例18: 大腸菌でのマウスサイクロフィリンBの作製) 上記実施例16で得られた、発現ベ

クターpET11MCPB1.1を含有するトランスフォーマントを、100μg/mlのアンピシリンを含むLB培地100mlに植菌し、37℃でプレカルチャーした。翌日、この菌体含有液10mlを、500mlのLB培地 (100μg/mlのアンピシリンを含む) に植菌し、合計4L分を37℃で培養した。600nmの吸光度が約0.7になったときに、IPTG 0.4mMを添加し、37℃にてさらに2時間培養した後、細胞を遠心分離で回収した。

【0104】 培養液2L分をリシスバッファー60mlで懸濁し、この懸濁液に1分間のソニケーションを15回行い、細胞を破碎した。細胞破碎液を、12,000rpmで10分間、4℃で遠心分離し、上清を得た。その上清に40%飽和分の硫酸アンモニウムを添加した。4℃で1時間放置後、12,000rpmで10分遠心分離し、上清を得た。上清をTris-HCl (pH8.0) に4℃で透析した。この透析後の溶液をTSK-gel DEAE-5PWに供し、20mM Tris-HCl (pH8.0) でNaCl濃度を0から1mMに増加させるグラジエントで溶出した。

【0105】 サイクロフィリンBの画分を集め、PBS (-) を加えて、限外ろ過装置 (分画分子量10,000) で濃縮した。この濃縮液をTSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>に供し、PBS (-) バッファーで精製を行った。サイクロフィリンBの画分を再度TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>により精製した。得られたマウスサイクロフィリンBを、大腸菌型マウスサイクロフィリンと称する。

【0106】 (実施例19: ペプチジルプロリルイソメラーゼ活性の測定) 上記実施例17および18で作製したサイクロフィリンBが正しい分子構造を取れているかどうかを、次のようにサイクロフィリンのペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を測定して判断した。

【0107】 シス-N-サクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-p-ニトロアニリジンを最終50μM、Hepesバッファー (pH8.0) を40mM、Triton-X100を0.015% (w/v) となるように加え (合計500μl)、次いでサイクロフィリンを50nM、5μl添加し、10℃でインキュベーションした。これに200μMキモトリプシンを50μl加えた後ただちに分光光度計にて、390nmの吸収を測定した (6秒ごとに150秒後まで測定した)。対照として、市販のサイクロフィリンA (ベーリンガーマンハイム社) を用いた。

【0108】 結果は市販のサイクロフィリンAを含め、すべてのサイクロフィリンBにイソメラーゼ活性は認められた。

【0109】 (実施例20: 大腸菌型ヒトサイクロフィリンBの造血幹細胞増殖活性の確認) ヒト臍帯血から調製した造血幹細胞 (CD34+CD38-細胞) を96

ウエルU型プレートの各5ウエルにプレーティングした(50細胞/100 $\mu$ l/ウエル)。造血幹細胞の増殖に使用した培地は、試験区では、15%FCS-RPMI 1640に、サイトカインであるSCF(25ng/ml)およびIL3(20ng/ml)を添加した培地(SCF/IL3培地)を用意し、これにさらに大腸菌型ヒトサイクロフィリンBを含有するサンプル(サイクロフィリンBを、2%FCS-RPMI 1640に200ng/mlで溶解させたもの)を20 $\mu$ l/ウエルで添加した培地であった。対照区では、サイクロフィリンを含有する上記サンプルの代わりに、2%FCS-RPMI 1640を20 $\mu$ l/ウエルでSCF/IL3培地に加えた培地を用いた。

【0110】37℃で14日間培養した後、5ウエルを1つにあわせ、この中に含まれる生細胞数をトリバンプルー法で測定した。SCF+IL3+ヒトサイクロフィリンBでは、1ウエル当たり1,600個の生細胞に対し、SCF+IL3+2%FCS-RPMI 1640の群では、40個であった(図4)。ヒトサイクロフィリンBが造血幹細胞を増殖させる効果を有することが明らかである。

【0111】(実施例21:大腸菌型ヒトサイクロフィリンB、大腸菌型マウスサイクロフィリンBおよび大腸菌型ヒトサイクロフィリンAの造血幹細胞増殖活性の確認)ヒト臍帯血から調製した造血幹細胞(CD34+CD38-細胞)を96ウエルU型プレートの各6ウエルにプレーティングした(200細胞/100 $\mu$ l/ウエル)。造血幹細胞の増殖に使用した培地は、試験区では、15%FCS-RPMI 1640に、サイトカインであるSCF(25ng/ml)、IL6(20ng/ml)、およびIL3(20ng/ml)を添加した培地(SCF/IL6/IL3)を用意し、これに実施

例17で得た大腸菌型ヒトサイクロフィリンBまたは実施例18で得た大腸菌型マウスサイクロフィリンBを含有するサンプル(大腸菌型ヒトサイクロフィリンB(M型、すなわち、ヒトサイクロフィリンBのN末端にMet残基が1つ付加されたもの)を200ng/mlおよび40ng/mlで、大腸菌型マウスサイクロフィリンBを200ng/mlおよび40ng/mlで、または市販の大腸菌型ヒトサイクロフィリンA(ベーリンガーマンハイム社製)を200ng/mlおよび40ng/mlを2%FCS-IMDMに溶解させたもの)を20 $\mu$ l/ウエルで添加した培地であった。対照区は、サイクロフィリンを含有する上記サンプルの代わりに、2%FCS-IMDMを20 $\mu$ l/ウエルでSCF/IL6/IL3培地に加えた培地を用いた。

【0112】37℃で13日間培養した後、6ウエルを1つにあわせ、細胞にCD34(FITC)抗体処理を行い、各一定時間FACSscanにて細胞の取り込みを行いCD34+細胞比率を求めた。一方、トリバンプルー法で生細胞数を測定し、生細胞数にその比率を乗じて算出し、CD34陽性細胞数を求めた。いずれのサイクロフィリンのサンプルにも、CD34+細胞増殖効果が認められた(図5)。

【0113】

【発明の効果】本発明により、サイクロフィリンを含有する造血幹細胞増殖剤が提供される。この造血幹細胞増殖剤は、各種の造血器官疾患、癌の放射線治療および化学療法の際の造血不全に対する治療薬として利用され得、血球の大量生産に利用され得、遺伝子治療時に造血幹細胞への遺伝子の導入効率の向上に利用され得、さらに診断薬および検査薬として活用され得る。

【0114】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```
<110>; KANEKA Corporation
<120>; Proliferation Agents for Hematopoietic Stem Cells
          Containing Cyclophilin
<130>; J199247690
<140>;
<141>;
<160>; 10
<170>; PatentIn Ver. 2.0
<210>; 1
<211>; 183
<212>; PRT
<213>; Homo sapiens

<400>; 1
Asp Glu Lys Lys Lys Gly Pro Lys Val Thr Val Lys Val Tyr Phe Asp
1             5             10             15
Leu Arg Ile Gly Asp Glu Asp Val Gly Arg Val Ile Phe Gly Leu Phe
```

20 25 30  
 Gly Lys Thr Val Pro Lys Thr Val Asp Asn Phe Val Ala Leu Ala Thr  
 35 40 45  
 Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Asn Ser Lys Phe His Arg Val Ile  
 50 55 60  
 Lys Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Thr Arg Gly Asp Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe Lys  
 85 90 95  
 Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val Ser Met Ala Asn Ala Gly Lys  
 100 105 110  
 Asp Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ala Trp  
 115 120 125  
 Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Leu Glu Gly Met Glu  
 130 135 140  
 Val Val Arg Lys Val Glu Ser Thr Lys Thr Asp Ser Arg Asp Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Asp Val Ile Ile Ala Asp Cys Gly Lys Ile Glu Val Glu Lys  
 165 170 175  
 Pro Phe Ala Ile Ala Lys Glu  
 180

&lt;;210&gt;; 2

&lt;;211&gt;; 183

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Mus sp.

&lt;;400&gt;; 2

Asn Asp Lys Lys Lys Gly Pro Lys Val Thr Val Lys Val Tyr Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Gln Ile Gly Asp Glu Ser Val Gly Arg Val Val Phe Gly Leu Phe  
 20 25 30  
 Gly Lys Thr Val Pro Lys Thr Val Asp Asn Phe Val Ala Leu Ala Thr  
 35 40 45  
 Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Asn Ser Lys Phe His Arg Val Ile  
 50 55 60  
 Lys Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Thr Arg Gly Asp Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe Lys  
 85 90 95  
 Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val Ser Met Ala Asn Ala Gly Lys  
 100 105 110  
 Asp Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ser Trp  
 115 120 125  
 Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Leu Glu Gly Met Asp  
 130 135 140  
 Val Val Arg Lys Val Glu Ser Thr Lys Thr Asp Ser Arg Asp Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Asp Val Ile Ile Val Asp Ser Gly Lys Ile Glu Val Glu Lys  
 165 170 175  
 Pro Phe Ala Ile Ala Lys Glu

180

&lt;;210&gt;; 3

&lt;;211&gt;; 164

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Homo sapiens

&lt;;400&gt;; 3

Val Asn Pro Thr Val Phe Phe Asp Ile Ala Val Asp Gly Glu Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Val Ser Phe Glu Leu Phe Ala Asp Lys Val Pro Lys Thr Ala  
 20 25 30  
 Glu Asn Phe Arg Ala Leu Ser Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys  
 35 40 45  
 Gly Ser Cys Phe His Arg Ile Ile Pro Gly Phe Met Cys Gln Gly Gly  
 50 55 60  
 Asp Phe Thr Arg His Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe Ile Leu Lys His Thr Gly Pro Gly Ile  
 85 90 95  
 Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe  
 100 105 110  
 Ile Cys Thr Ala Lys Thr Glu Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe  
 115 120 125  
 Gly Lys Val Lys Glu Gly Met Asn Ile Val Glu Ala Met Glu Arg Phe  
 130 135 140  
 Gly Ser Arg Asn Gly Lys Thr Ser Lys Lys Ile Thr Ile Ala Asp Cys  
 145 150 155 160

Gly Gln Leu Glu

&lt;;210&gt;; 4

&lt;;211&gt;; 163

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Mus sp.

&lt;;400&gt;; 4

Val Asn Pro Thr Val Phe Phe Asp Ile Thr Ala Asp Asp Glu Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Val Ser Phe Glu Leu Phe Ala Asp Lys Val Pro Lys Thr Ala  
 20 25 30  
 Glu Asn Phe Arg Ala Leu Ser Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys  
 35 40 45  
 Gly Ser Ser Phe His Arg Ile Ile Pro Gly Phe Met Cys Gln Gly Gly  
 50 55 60  
 Asp Phe Thr Arg His Asn Gly Thr Gly Gly Arg Ser Ile Tyr Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe Ile Leu Lys His Thr Gly Pro Gly Ile  
 85 90 95  
 Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe  
 100 105 110  
 Ile Cys Thr Ala Lys Thr Glu Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe  
 115 120 125

Gly Lys Val Lys Glu Gly Met Asn Ile Val Glu Ala Met Glu Arg Phe

130

135

140

Gly Ser Arg Asn Gly Lys Thr Ser Lys Lys Ile Thr Ile Ser Asp Cys

145

150

155

160

Gly Gln Leu

<;210>; 5

<;211>; 35

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: primer  
sequence

<;400>; 5

gacatatgat ggaagagaag aagaaggggc ccaaa

35

<;210>; 6

<;211>; 33

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: primer  
sequence

<;400>; 6

ctgaattctc tactccttgg cgatggcaaa ggg

33

<;210>; 7

<;211>; 35

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: primer  
sequence

<;400>; 7

gacatatgat gaacgataag aagaaggac ctaa

35

<;210>; 8

<;211>; 33

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: primer  
sequence

<;400>; 8

ctgaattctc tactccttgg caatggcgaa ggg

33

<;210>; 9

<;211>; 185

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 9

Gly Phe Arg Lys Arg Gly Pro Ser Val Thr Ala Lys Val Phe Phe Asp

1

5

10

15

Val Arg Ile Gly Asp Lys Asp Val Gly Arg Ile Val Ile Gly Leu Phe

20

25

30



Gly	Lys	Val	Val	Pro	Lys	Thr	Val	Glu	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	
35				40				45								
Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Gly	Ser	Lys	Phe	His	Arg	Val	Ile	
50				55				60								
Lys	Asp	Phe	Met	Ile	Gln	Gly	Gly	Asp	Ile	Thr	Thr	Gly	Asp	Gly	Thr	
65				70				75				80				
Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Glu	Thr	Phe	Pro	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	
85				90				95								
Leu	Lys	His	Tyr	Gly	Ile	Gly	Trp	Val	Ser	Met	Ala	Asn	Ala	Gly	Pro	
100				105				110								
Asp	Thr	Asn	Gly	Ser	Gln	Phe	Phe	Ile	Thr	Leu	Thr	Lys	Pro	Thr	Trp	
115				120				125								
Leu	Asp	Gly	Lys	His	Val	Val	Phe	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Gly	Met	Thr	
130				135				140								
Val	Val	His	Ser	Ile	Glu	Leu	Gln	Ala	Thr	Asp	Gly	His	Asp	Arg	Pro	
145				150				155				160				
Leu	Thr	Asn	Cys	Ser	Ile	Ile	Asn	Ser	Gly	Lys	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	
165				170				175								
Pro	Phe	Val	Val	Glu	Ile	Ala	Asp	Trp								
180				185												

 $\langle 210 \rangle$ ; 10

&lt;:211&gt;: 185

&lt;:212&gt;: PRT

&lt;:213&gt;: Mus sp.

&lt;:400&gt;: 10

Gly Val Arg Lys Arg Gly Pro Ser Val Thr Asp Lys Val Phe Phe Asp  
1 5 10 15

Val	Arg	Ile	Gly	Asp	Lys	Asp	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Ile	Gly	Leu	Phe	
20							25					30				
Gly	Asn	Val	Val	Pro	Lys	Thr	Val	Glu	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	
35							40					45				
Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Gly	Ser	Ile	Phe	His	Arg	Val	Ile	
50							55					60				
Lys	Asp	Phe	Met	Ile	Gln	Gly	Gly	Asp	Phe	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Thr	
65							70					75				80
Gly	Gly	Met	Ser	Ile	Tyr	Gly	Glu	Thr	Phe	Pro	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	
85							90					95				
Leu	Lys	His	Tyr	Gly	Ile	Gly	Trp	Val	Ser	Met	Ala	Asn	Ala	Gly	Pro	
100							105					110				
Asp	Thr	Asn	Gly	Ser	Gln	Phe	Phe	Ile	Thr	Leu	Thr	Lys	Pro	Thr	Trp	
115							120					125				
Leu	Asp	Gly	Lys	His	Val	Val	Phe	Gly	Lys	Val	Leu	Asp	Gly	Met	Thr	
130							135					140				
Val	Val	His	Ser	Ile	Glu	Leu	Gln	Ala	Thr	Asp	Gly	His	Asp	Arg	Pro	
145							150					155				160
Leu	Thr	Asp	Cys	Thr	Ile	Val	Asn	Ser	Gly	Lys	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	
165							170					175				
Pro	Phe	Val	Val	Glu	Val	Pro	Asp	Trp								
180							185									

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 NS-1細胞培養上清のゲルろ過画分の逆相HPLCによる精製クロマトパターン、および各画分のヒト臍帯血造血幹細胞増殖活性を示す図である。図1

(a)は、縦軸にそれぞれの画分についての造血幹細胞増殖検出系で増殖した細胞数を、そして横軸にリテンション時間(分)を示す。ドットの多いカラムは、造血幹細胞増殖因子検出系にて培養25日目に見られたCD34<sup>+</sup>細胞の数を；黒いカラムは、造血幹細胞増殖因子検出系にて培養32日目に見られたCD34<sup>+</sup>細胞の数を；白いカラムは、造血幹細胞増殖因子検出系にて培養25日目に見られたCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞の数を；そしてドットの少ないカラムは、造血幹細胞増殖因子検出系にて培養32日目に見られたCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞の数を示す。図1(b)は、縦軸にそれぞれの画分についての214nmでの吸収を、そして横軸にリテンション時間(分)を示す。214nmでの吸収は、それぞれの画分に含まれるタンパク質量を反映する。

【図2】 NS-1細胞無血清培養上清のゲルろ過画分の逆相HPLCによる精製クロマトパターンを、その中

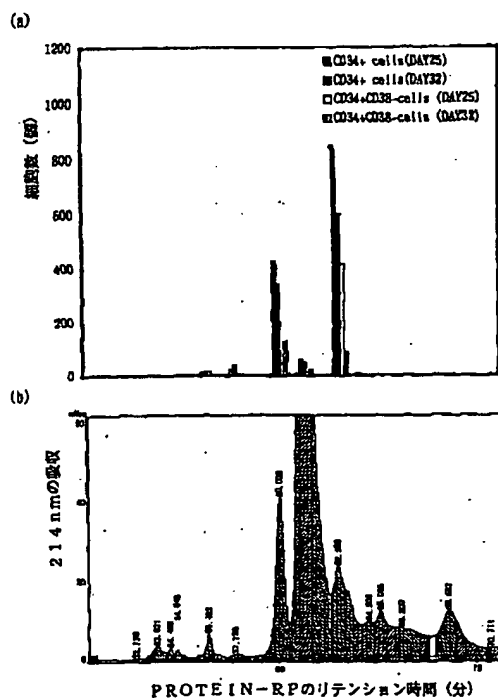
でマウスサイクロフィリンB、マウスサイクロフィリンAおよびマウス修飾型サイクロフィリンAの画分を明示して示した図である。図2は、縦軸にそれぞれの画分についての214nmでの吸収を、そして横軸にリテンション時間(分)を示す。214nmでの吸収は、それぞれの画分に含まれるタンパク質量を反映する。

【図3】 NS-1細胞無血清培養上清から精製したマウスサイクロフィリンB、マウスサイクロフィリンAおよびマウス修飾型サイクロフィリンAのヒト臍帯血造血幹細胞増殖活性(培地は、SCF、IL6およびIL3(3因子)を含有する)を、他のサイトカインと比較して示す図である。図3は、縦軸がCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞数を示し、そして横軸が添加したサンプルの種類を示す。

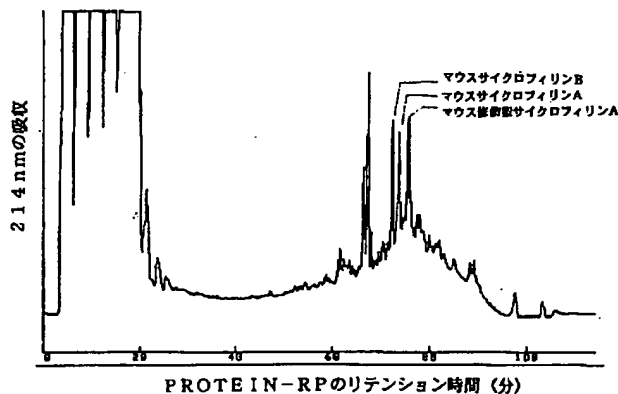
【図4】 大腸菌型ヒトサイクロフィリンBのヒト臍帯血造血幹細胞増殖活性を示す図である。

【図5】 大腸菌型ヒトサイクロフィリンB、大腸菌型マウスサイクロフィリンBおよび大腸菌型ヒトサイクロフィリンAのヒト臍帯血造血幹細胞増殖活性(CD34<sup>+</sup>細胞の増殖を指標とする)を示す図である。

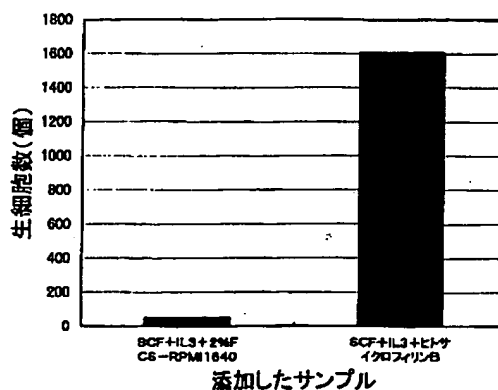
【図1】



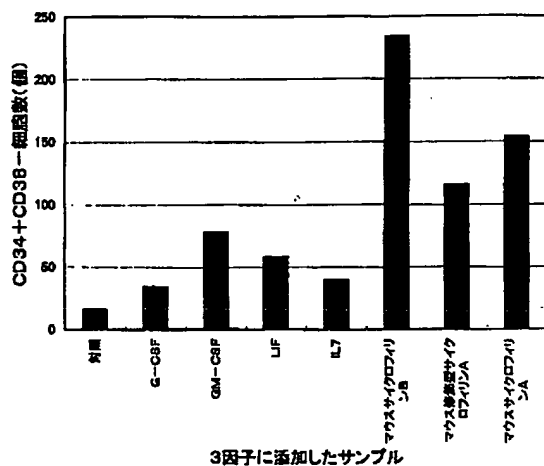
【図2】



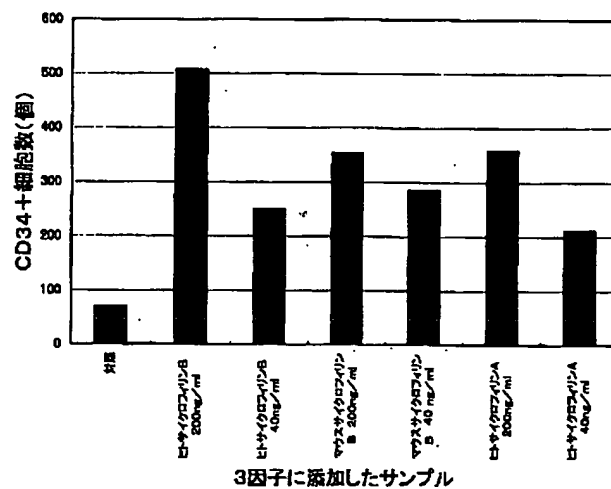
【図4】



【図3】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

FI

テームド(参考)

C 07 K 14/52

C 12 P 21/02

C 4 H 045

C 12 N 15/09

ZNA

G 01 N 33/15

Z

C 12 P 21/02

33/50

T

G 01 N 33/15

33/68

33/50

A 61 K 37/02

33/68

C 12 N 15/00

ZNAA

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA34 BB20 CB01 CB17

CB26 DA36 DA77

4B024 AA01 BA21 CA04 DA03 DA06

EA04 GA11 HA01

4B064 AG02 CA02 CA10 CA19 CC24

CE07 CE10 DA01

4C084 AA02 AA06 AA17 BA01 BA08

BA22 BA23 CA18 CA23 CA27

CA56 NA05 NA14 ZA511

ZA512 ZB011 ZB012 ZB221

ZB222

4C087 AA01 AA02 BB44 BB64 CA16

CA44 NA05 NA14 ZA51 ZB22

4H045 AA10 AA20 BA10 CA42 DA01

EA24 FA72 FA74 GA10 GA25

**HEMATOPOIETIC STEM CELL GROWTH AGENT CONTAINING  
CYCLOPHILIN**

Patent Number: JP2001163798

Publication date: 2001-06-19

Inventor(s): OHARA TAKAAKI;; YAMASHITA KENJI;; KYOIZUMI MASAYUKI

Applicant(s): KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

Requested  
Patent: ☐ JP2001163798Application  
Number: JP19990345542 19991203Priority Number  
(s):IPC A61K38/00; A61K35/28; A61P7/00; A61P37/00; A61P43/00; C07K14/52; C12N15/09;  
Classification: C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/68

EC Classification:

Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain both a hematopoietic stem cell growth method capable of proliferating human hematopoietic stem cell and hematopoietic precursor cell outside of the body more efficiently than a conventional method and a hematopoietic stem cell growth agent usable as a therapeutic agent for various kinds of hematopoietic organ diseases and hematopoietic insufficiency in radiotherapy and chemotherapy of cancer, usable for mass production of hematocytes and improvement in introduction efficiency of gene to hematopoietic stem cell in gene therapy and usable as a diagnostic and an examination medicine.

**SOLUTION:** This hematopoietic stem cell growth agent contains cyclophilin. The cyclophilin is a polypeptide containing any of amino acid sequence of sequence number 1, 2, 3 or 4 in the corresponding specification or a polypeptide containing an amino acid sequence in which one or several amino acids are substituted, deleted or added for/from/to any of the amino acid sequence of the sequence number 1, 2, 3 or 4 and having hematopoietic stem cell growth activity or their modified substances.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2